

**ORIENTATION CONTROLLING TOOL FOR CELL, PRODUCTION THEREOF AND METHOD FOR CONTROLLING ORIENTATION OF CELL**

**Publication number:** JP3007576

**Publication date:** 1991-01-14

**Inventor:** MATSUDA TAKEHISA; INOUE KAZUHIKO; TANI NOBUTAKA

**Applicant:** KANEGAFUCHI CHEMICAL IND

**Classification:**

**- international:** G01N27/327; C12M3/04; C12N5/00; C12N5/10; G03F7/26; H01L21/027; H01L21/30; H01L49/00; G01N27/327; C12M3/04; C12N5/00; C12N5/10; G03F7/26; H01L21/02; H01L49/00; (IPC1-7): C12M3/04; C12N5/00; G01N27/327; G03F7/26; H01L21/027; H01L49/00

**- European:**

**Application number:** JP19890141964 19890603

**Priority number(s):** JP19890141964 19890603

Report a data error here

**Abstract of JP3007576**

**PURPOSE:** To obtain a fine pattern with a high resolution of mum order by forming an orientation pattern composed of a cell adhesive and a cell nonadhesive surfaces. **CONSTITUTION:** A cell nonadhesive hydrophilic polymer, composed of a hydrophilic polymer (e.g. PVA) without any electric charge and a compound (e.g. sodium 4,4'-diazidostilbene-2,2'-disulfonate) and having photosensitivity is applied or adsorbed on the surface in which a polymer having cell adhesion (e.g. polyacrylic acid) is immobilized and then irradiated with light through a photomask having a desired orientation pattern, subsequently washed and developed to form an image of the cell nonadhesive hydrophilic polymer.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

## ⑫ 公開特許公報(A) 平3-7576

⑬ Int. Cl.<sup>9</sup>

C 12 M 3/04  
C 12 N 5/00  
G 01 N 27/327  
G 03 F 7/26  
H 01 L 21/027  
49/00

識別記号

庁内整理番号

8717-4B  
6807-4B  
  
7124-2H  
  
7733-5F  
7363-2G  
2104-5F  
2104-5F  
6807-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)1月14日

G 01 N 27/30 3 5 1  
H 01 L 21/30 3 6 1 Z  
C 12 N 5/00 L  
A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全7頁)

① 発明の名称 細胞の配列制御用具、その製法および細胞の配列制御法

② 特 願 平1-141964

③ 出 願 平1(1989)6月3日

④ 発 明 者 松 田 武 久 大阪府箕面市栗生外院244-1 B-512  
⑤ 発 明 者 井 上 和 彦 兵庫県神戸市須磨区横尾8丁目1-1 42-504  
⑥ 発 明 者 谷 絃 孝 大阪府大阪市阿倍野区文の里4丁目17-29  
⑦ 出 願 人 鐘淵化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号  
⑧ 代 理 人 弁理士 朝日奈 宗太 外2名

⑨ 月 糸田 穂

る 工 程

また は

## 1 発 明 の 名 称

細胞の配列制御用具、その製法および細胞の  
配列制御法

(1) 感光性を有する細胞接着性親水性高分子を  
細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させて  
存在させる工程、

## 2 特 許 請 求 の 範 囲

1 細胞接着性表面および細胞非接着性表面よ  
りなる配列パターンを有することを特徴とす  
る細胞の配列制御用具。

(2) (1) でえられた表面上に望む配列パターンを  
有するフォトリソマスクを設置してパターン露光  
する工程および

2 細胞接着性表面および細胞非接着性表面よ  
りなる配列パターンが、

(3) 洗浄により現像し、細胞接着性親水性高分子よりなる像を細胞非接着性表面に形成させる工程

(1) 感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

を経て形成されることを特徴とする細胞の配  
列制御用具の製法。

(2) (1) でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトリソマスクを設置してパターン露光する工程および

3 請求項1記載の細胞の配列制御用具を用いて細胞を増殖することを特徴とする細胞の配列制御法。

(3) 洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させ

## 3 発 明 の 詳 細 な 説 明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、細胞の配列制御用具、その製法お

よび細胞の配列制御法に関する。

〔従来の技術〕

近年、細胞工学、LSI 技術、医工学などの急激な進歩とともに、細胞を用いた超小型バイオセンサー、スイッチング素子、バイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器、さらにはニューロコンピュータなどが注目を集め、これらの開発が活発に行なわれている。

細胞を望むように配列させ、しかもその機能を維持させておくことは難しく、細胞を用いたデバイス実現の一つの障壁となっている。細胞を望むように配列させて回路網を形成させるといような細胞の配列制御技術は、これらのデバイス実現のための大きなキーテクノロジーとなりうる。

〔発明が解決しようとする課題〕

細胞の配列を制御する試みとしては、インクジェットプリンターを用いて細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンを塗布してパターンを形成し、この上で細胞を培養させた例があるが、

の配列制御用具、

細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンが、

(1) 感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2) (1) でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3) 洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させる工程

または

(1) 感光性を有する細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2) (1) でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトマスクを設置してパターン露光する工程および

(3) 洗浄により現像し、細胞接着性親水性高分子

解像度がわるく不均一であり、微細加工には適していない。

また、最近、人工的な凹凸面を用いて神経細胞シナプス成長の方向制御を試みた例があるが、望むような配列を形成させるまでには至っていない。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者らは、このような実状に鑑み、細胞の配列を容易に制御する方法について鋭意研究を重ねた結果、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する材料表面上で細胞を培養することにより、細胞の配列が容易に制御できること、細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有する細胞の配列制御用具が、特定の工程を経て容易に製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりなる配列パターンを有することを特徴とする細胞

よりなる像を細胞非接着性表面に形成させる工程

を経て形成されることを特徴とする細胞の配列制御用具の製法、ならびに

前記細胞の配列制御用具を用いて細胞を培養することを特徴とする細胞の配列制御法に関する。

〔実施例〕

本発明の細胞の配列制御用具は、パターン化した細胞接着性表面と細胞非接着性表面とが本発明の細胞の配列制御用具となる材料の表面に形成されたものである。

前記細胞接着性表面とは、カルボキシル基やアミノ基などの電荷を有する官能基および（または）RDS(Arg-Gly-Asp-Ser) のような細胞接着性ペプチドを導入した表面、または細胞接着性を有する高分子を固定した表面をいう。

前記カルボキシル基やアミノ基などの官能基は、本発明の配列制御用具となる材料表面をプラズマなどの放射線で処理することにより導入

することができる。この際の前記材料としてはプラスチック製の培養皿、フィルム、チューブなどを利用しうる。

前記細胞接着性を有する高分子の具体例としては、たとえばポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレンスルホン酸、ポリアリルアミンなどの電荷を有する合成高分子、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、デキストラン硫酸、ケラタン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、キチンなどの電荷を有する多糖類、コラーゲン、ゼラチン、フィブロネクチン、ハイドロネクチンなどの細胞接着性蛋白質、さらには細胞接着性蛋白質や細胞接着性ペプチドを固定した合成高分子などがあげられるが、これらに限定されるものではない。これらは単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

また、前記細胞非接着性表面とは、接触角が100度以上の疎水性表面、または電荷を有さず接触角が50度以下の親水性表面をいう。

前記疎水性表面の具体例としては、たとえば

る配列パターンを

(1)感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させて存在させる工程、

(2)(1)でえられた表面上に望む配列パターンを有するフォトリソマスクを設置してパターン露光する工程および

(3)洗浄により現像し、細胞非接着性親水性高分子よりなる像を細胞接着性表面に形成させる工程

を経て形成する方法を説明する。

第1の製法においては、たとえば細胞非接着性親水性高分子、好ましくは前記電荷を持たない親水性高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物とからなる組成物を本発明の細胞の配列制御用具となる細胞接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞接着性表面に容易に固定される。また、前記高分子に直接アジド基を導入したものを用いることもできるが、アジド基を導入する特別な操作

ポリテトラフルオロエチレン、シリコンなどから形成された表面があげられるが、これらに限定されるものではない。

また、前記接触角が50度以下の親水性表面の具体例としては、電荷を持たない親水性高分子よりなる表面、たとえばポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシエチルメタクリレート、さらにはこれらを構成する単量体の共重合体、セルロースなどがあげられるが、これらに限定されるものではない。

さらに、本発明の細胞の配列制御用具を形成しうる素材としては、たとえば各種プラスチック、ガラス、金属などがあげられ、すでにデバイスとして用いられているたとえば培養皿、半導体基盤などの材料も利用できる。

つぎに前記細胞の配列制御用具の製法について説明する。

まず第1の製法として、

細胞接着性表面および細胞非接着性表面よりな

が不要な点および現像時の未反応物の除去が容易な点で、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を用いるのが好ましい。

前記2個以上のアジド基を有する化合物としては、たとえば第1表に示すような一般のビスアジド化合物、1分子中に2個以上のアジド基を導入したアジド化ポリマーなどが利用できるが、これらに限定されるものではない。上記アジド基には、たとえばカルボニルアジド

( $R-CO-N_3$ )、スルホニルアジド( $R-SO_2-N_3$ )、芳香族アジド( $R-C_6H_4-N_3$ )などがあるが、安定性のよい芳香族アジドまたはスルホニルアジドが好ましい。また、より長波長の光でナイトレンに転化できる点で、ニトロ基のような電子吸引性置換基を有する芳香族アジド、i線またはg線感光性のビスアジド化合物がさらに好ましい。



より、短波長紫外線による該高分子や材料表面への影響を軽減することができる。これは蛋白質などの親水性高分子を用いるばあいとくに好ましい。

また、ナイトレン基の反応は極めて短時間で完了するため、露光時間は5分以内でよい。

パターン露光の方法は、パターンを有するフォトリソグラフィ装置を設置した上より光照射する方法、エキシマレーザーによるリソグラフィ装置を利用する方法などがある。

一方、細胞の配列制御用具の第2の製法は、前記第1の製法の(1)の工程において、感光性を有する細胞非接着性親水性高分子を細胞接着性表面に塗布もしくは吸着させるかわりに、感光性を有する前記細胞接着性親水性高分子を細胞非接着性表面に塗布もしくは吸着させるほかは、第1の製法と同様にして製造する方法である。

第2の製法によれば、たとえば前記細胞接着性を有する高分子が、該高分子と2個以上のアジド基を有する化合物よりなる組成物を本発明

の細胞の配列制御用具となる細胞非接着性表面に存在させたのち、光照射することにより、細胞非接着性表面に容易に固定される。

前記のごとく製造される細胞の配列制御用具を用い、常法により細胞を培養することにより、細胞配列を容易に制御でき、 $\mu\text{m}$ オーダーまでの高解像度の微細パターンを形成することができる。

えられた微細パターンは、超小型バイオセンサー、スイッチング素子、パイオリアクター、ハイブリッド型人工臓器などの製造、さらにはニューロコンピュータなどの開発に有用である。

つぎに実施例を用いて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実施例1

N,N-ジメチルアクリルアミドモノマー（調製人製）をアセトン中、過酸化ベンゾイルおよびN,N-ジメチル-p-トルイジルをレドックス系開

始剤として重合し、ポリ(N,N-ジメチルアクリルアミド)（以下、PDHAAという）をえた。

えられたPDHAA 95部（重量部、以下同様）に対して、ビスアジド化合物である4,4'-ジアジドスチレン-2,2'-ジスルホン酸ソーダ5部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1%（重量%、以下同様）溶液とした。

この溶液を、組織培養用ポリスチレンシャーレ（コーニング（CORNING）社製）上に滴下し、キャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、この上に第3図に示すような開孔部と非開孔部とからなる一対の幅が $250\mu\text{m}$ であるスリットを有するフォトリソマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて30秒間パターン露光した。なお、第3図はフォトリソマスクの写真のスケッチ図である。

つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PDHAAおよびシャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

このようにしてえたシャーレに、牛血管内皮

細胞を播種し、15%子牛血清（FCS）を含むDHBM（Dulbecco's Modified Eagle's Medium）を培地として用い、37℃のCO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養したところ、内皮細胞はPDHAA非固定部（非露光部）のみに選択的に伸展・増殖し、第1図および第2図に示す細胞の配列パターンがえられた。第1図は染色された細胞の配列パターンの写真（倍率は第3図のものになる写真と同じ）のスケッチ図、第2図は第1図のものになる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図である。

#### 実施例2

実施例1のばあいと同様にして調製したビスアジド化合物を含むPDHAAの0.1%メタノール溶液を、ポリスチレンシャーレ上に滴下し、キャスト製膜して風乾してのち、高圧水銀灯を用いて紫外線を照射し、PDHAAを光固定したシャーレ（以下、PDHAAシャーレという）をえた。

N,N-ジメチルアクリルアミド80部とアクリロキシシロキサン酸イミド（国産化学製）20部よりな

る共重合体とフィブロネクチンとを、リン酸緩衝液 (pH8.5) 中で反応させ、フィブロネクチンを固定したN,N-ジメチルアクリルアミド共重合体 (以下、PN-PDMAAという) をえた。

PN-PDMAA 95 部に対してビスアジド化合物 5 部を混合したものをメタノールに溶かし、0.1% 溶液とした。

えられた溶液をPDMAA シャーレ上にキャスト製膜して風乾し、厚さ数十nmの膜を形成したのち、フォトマスクをセットし、高圧水銀灯を用いて 80 秒間パターン露光した。

つぎにメタノール、水で充分洗浄して現像し、PN-PDMAA および PDMAA シャーレ表面よりなる微細パターンを形成したシャーレをえた。

このようにしてえたシャーレを用いて実施例 1 のばあいと同様にして、牛血管内皮細胞を培養したところ、内皮細胞は、PN-PDMAA 固定部 (露光部) のみに選択的に伸展・増殖し、細胞による配列パターンがえられた。

【発明の効果】

本発明の細胞の配列制御用具は、細胞の付着の有無の選択性がよく、これを用いることにより、従来の細胞培養と同様にして培養を行なうことが容易に精度の高い細胞配列制御をすることができ、極めて微細かつ高解像度の細胞配列パターンを容易に形成することができる。

また、本発明の製法により、前記配列制御用具を容易に製造することができる。

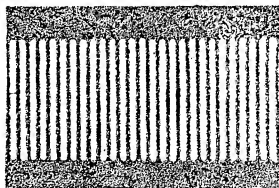
本発明は、各種細胞機能に応用した超小型バイオセンサー、スイッチング素子、ハイブリッド型人工臓器、バイオリアクター、ニューロコンピュータなどの開発に大きく貢献するものである。また、細胞間の情報伝達などの細胞機能の研究においても応用できるものである。

#### 4 図面の簡単な説明

第 1 図は染色された細胞の配列パターンの写真のスケッチ図、第 2 図は第 1 図のもとなる写真よりもさらに拡大された写真のスケッチ図、第 3 図はフォトマスクの写真 (倍率は第 1 図の

もとなる写真と同じ) のスケッチ図である。

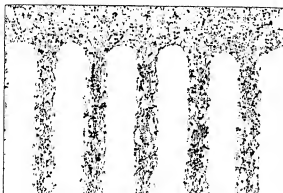
第 1 図



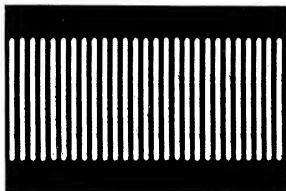
特許出願人 鐘淵化学工業株式会社  
代理人 井理士 朝日奈宗太 はか 2 名



第 2 図



第 3 図



# 手続補正書 (自発)

平成1年7月28日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

## 1 事件の表示

平成1年特許願第141964号

## 2 発明の名称

細胞の配列制御用具、その製法および細胞の配列制御法

## 3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 大阪市北区中之島三丁目2番4号

名 称 (094) 鐘淵化学工業株式会社

代表者 髙 村

## 4 代理人 平 5 4 0

住 所 大阪市中央区谷町2丁目2番22号

N Sビル

氏 名 (0522) 弁理士 朝 日 奈 宗

電話 (08) 943-8822

方 式 限  
番 査

特許  
大  
理  
士  
印  
記

ほか2名



## 5 補正の対象

(1) 明細書の「発明の詳細な説明」の欄

## 6 補正の内容

(1) 明細書17頁2行の「Dulbdcco's」を  
「Dulbecco's」と補正する。

以 上